

# バイオリアクターにおけるタバコ細胞の増殖および 二次代謝物生産に関する速度論的研究

著者	柴? 尚美
号	1584
発行年	1993
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/6857">http://hdl.handle.net/10097/6857</a>

氏 名	柴 崎 尚 美
授 与 学 位	博 士 ( 工 学 )
学位授与年月日	平成 6 年 3 月 25 日
学位授与の根拠法規	学位規則第 5 条第 1 項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 化学工学専攻
学 位 論 文 題 目	バイオリアクターにおけるタバコ細胞の増殖 および二次代謝物生産に関する速度論的研究
指 導 教 官	東北大学教授 只木 楨力
論 文 審 査 委 員	東北大学教授 只木 楨力      東北大学教授 鈴木 睦 東北大学教授 西野 徳三      東北大学教授 野澤 庸則

## 論 文 内 容 要 旨

植物細胞培養技術は、医薬品原料や香料、染料などの有用物質を工業的に生産するための有力な手段として注目されている。近年、この技術を用いた物質生産に関する研究が盛んに行われているが、実際に工業化に至った例は数少ない。この主な原因として、大量培養や培養槽の最適設計などに関する知見が不十分であるため、生産量の割には設備費が高価となってしまう、コスト高を引き起こしていることが挙げられる。従って、効率的な工業生産プロセスを確立するためには、細胞当たり、あるいは培養槽単位体積当たりの生産性向上に繋がる各種因子の解明や新たな培養槽の開発、さらには、そのプロセスの制御や最適化のために必要となる、培養槽内生物現象を定量的に表現できる速度論モデルの構築という広範囲にわたる研究が必要になると考えられる。

本研究は、培養槽当たりの生産性を向上させるための操作因子の解明、ならびに植物細胞培養における細胞増殖や二次代謝物生産などの生物現象を良好に表現するための速度論モデルの構築を目的として、培養工学的、速度論的な立場から種々の検討を行ったものである。本論文は全編 5 章より構成されており、以下に各章の内容を要約する。

### 第 1 章 緒 論

植物細胞培養技術の概要、ならびにその技術を用いた有用物質生産の有効性を述べると共に、現状での問題点を指摘し、それに基づいた本研究の目的および概要を述べた。

## 第2章 バイオリアクターにおけるタバコ細胞の増殖特性

植物細胞培養用リアクターでは、微生物に比べ、培養期間が長くなるために起こりやすい雑菌汚染に対する十分な対策と、細胞破壊を引き起こすことなく基質を十分に混合できるような適度な通気と攪拌が重要であると言われている。このため、微生物培養用の攪拌槽型リアクターの使用は適さず、現在のところ、通気攪拌型やエアリフト型が広く用いられている。しかし、これらのリアクターも、培養液の泡立ちや壁面への細胞付着などの問題点を抱えているため、新たな培養槽の開発が急務となっており、そのために必要となる培養槽当たりの生産性向上に関する知見の蓄積が望まれている。

本章では、従来から微生物培養で広範に利用され、植物細胞培養においても有力とされているドラフトチューブ付エアリフト型と、近年植物細胞培養用に開発されたロータリードラム型の2種のリアクターを用いて、工学的な立場からタバコ細胞培養を行い、増殖に及ぼす各種操作因子の影響を定量的に検討すると共に、各リアクターにおける最適操作条件の探索、ならびに培養特性の検討を行った。

操作因子として、供給ガス中の酸素濃度、通気速度、およびドラムの回転速度を取り上げて検討を行ったところ、各因子は、それぞれ、あるレベルまでの増加は増殖を促進するが、そのレベルを超えると逆に抑制することが明らかとなり、これより、各因子に細胞増殖に関する最適値の存在が示された。また、エアリフト型では、良好な増殖が観察される操作条件の範囲がかなり狭く、特に通気速度に関してはこのことが顕著であるのに対し、ロータリードラム型では、どの条件でもある程度良好な増殖が観察され、この範囲が広いことが分かった。

さらに、両リアクターの培養特性の検討により、エアリフト型の方が酸素供給能に優れているが、ロータリードラム型の方が細胞に与える剪断力が穏やかであり、細胞増殖能も優れていることが分かった。これより、培養槽当たりの生産性の向上には、酸素供給能の促進よりも剪断力の抑制の方が重要な因子であることが示された。

## 第3章 タバコ細胞の増殖および二次代謝物生産に関する速度論モデル

細胞培養に関する速度論モデルは、一般に、平均細胞近似と均衡増殖仮定を用いて構築されている。前者は細胞毎の組成の違いを無視し、各細胞が全細胞の平均的な組成を有することを、後者は細胞年令に伴う組成変化を無視し、細胞が同じ組成を保ったまま増殖することを、それぞれ考えるものである。速度論モデルは、これらの2つの仮定の有無によって4つのカテゴリーに分類されることになるが、これまでに報告されたモデルは、すべてこの平均細胞近似を行ったものであり、しかも、その大部分は、均衡増殖も仮定し、生物現象を最も単純化した、いわゆる非構造化モデルであり、これを仮定しない構造化モデルは極めて少数である。

微生物培養では、この非構造化モデルでもその生物現象をある程度表現できることが知られているが、植物細胞培養では、年令と共に細胞サイズが増加し組成も変化するため、均衡増殖仮定が成立しないと考えられ、非構造化モデルを適用することは必ずしも適当とはいえない。そこで、近年、植物細胞培養を表現するためのモデルとして構造化モデルが注目されている。このモデルでは、時

間に伴う細胞の組成変化を考慮するために、状態変数が2個以上用いられており、その状態変数の考え方によって、Frazier<sup>1)</sup>やHookerら<sup>2)</sup>の化学量論に基づくものと、Baileyら<sup>3,4)</sup>の細胞構造に基づくものに分類される。しかし、前者のモデルでは組成変化を表現することはできても、細胞破壊を表現することは困難であり、後者では細胞破壊自体は表現できるものの、状態変数として湿重量と乾燥重量を考えているため、これらを細胞構造に対応させるのが困難である。

一般に、植物細胞の液胞量やその含有率は年令と共に著しく増加し、しかも、液胞が増加した分だけ細胞サイズが大きく細胞壁が薄くなっていくことが知られている。前者が最も顕著に見られる植物細胞の組成変化であり、後者が流体剪断力による細胞破壊の原因であると考えられる。また、植物細胞の二次代謝物の多くは液胞内に水溶液の形で蓄積されることも知られており、これらを考えた場合、細胞構造に基づいた状態変数として、湿重量や乾燥重量よりも、むしろ、液胞量を考えて方が自然であると思われる。本章では、これらの植物細胞培養の特徴を液胞に基づいて考慮した新たな構造化速度論モデルを構築し、これをエアーリフト型リアクターによるタバコ細胞培養に適用し、その妥当性を検討した。

モデルの構築では、まず、これまでのモデルと同様に、平均細胞近似を行った上で、細胞が「液胞」とそれ以外の「非液胞」から構成されると考えた。この場合、液胞は二次代謝物を溶解した低濃度の水溶液であるため、非液胞とは液胞以外のもの、すなわち、水分をある程度有する核、細胞質、細胞壁などの固形分からなると考えることができる。そこで、これらが各々異なる速度で増加するとして、組成変化を表現した。また、細胞破壊に関しては、液胞含有率が大きいほどそれが起こり易いと仮定し、二次代謝物生産に関しても、その速度を液胞量の増加に関連づけた。

以上の考え方に基づいて構築された本モデルを、タバコ細胞培養に適用したところ、細胞増殖や二次代謝物生産などの生物現象を良好に表現することができた。また、前述したBaileyらのモデルの適用結果と比較しても、本モデルの方がその表現力において優れていることが明らかとなった。本モデル特有の定数である非液胞の含有率の推算値も、植物細胞の一般値と矛盾しないことから、本モデルの生化学的妥当性も確認された。さらに、細胞外に放出された二次代謝物濃度に関してシミュレーションを行ったところ、シミュレーション結果と実験結果は良好に一致しており、本モデルによって生物現象の予測もある程度できることが分かった。

#### 第4章・タバコ細胞の増殖および二次代謝物生産に及ぼす培地中の初期糖濃度の影響

細胞培養の速度論に関する研究は、一般に、ある特定の栄養素を非過剰濃度とし、その他を大過剰とした条件下で行われている。この栄養素が制限基質であり、植物細胞培養では、炭素源である糖（スクロース）が重要な基質の1つであるといわれている。しかし、この糖に関する研究は盛んに行われてはいるものの、その多くは糖濃度の増減が細胞増殖や二次代謝物生産に対して阻害となるか、促進となるかを実験的に明らかにしたものであり、その関係を速度式を用いて表現しようとする試みは極く僅かしか行われていない。また、培地中に添加された二種類であるスクロースは、細胞壁内に含まれる酵素であるインベルターゼによって、単糖類であるグルコースとフルクトース

に加水分解されつつ細胞内に吸収されることも知られているが、その分解仮定を速度論に取り入れることの意義は明らかではない。

本章では、前述した2種のリアクターによるタバコ細胞培養において、細胞増殖や二次代謝物生産などの生物現象に及ぼす初期スクロース濃度の影響を実験的に明らかにすると共に、3章のモデルに、スクロースの加水分解過程を取り入れたモデルを構築し、その分解過程を考慮することの意義を速度論的立場から検討した。

初期スクロース濃度の影響の検討により、細胞量や二次代謝物量は、どちらのリアクターでも、糖濃度の減少に伴い小さくなっているが、細胞増殖や二次代謝物生産は、糖が十分に存在する場合はロータリードラム型の方が、これが少ない場合はエアリフト型の方が、それぞれ有効であることが分かった。さらに、糖濃度が低い場合、順調な細胞増殖や二次代謝物生産を引き起こすために、ある程度高い酸素供給能が必要になるという結果を得た。

また、モデルの構築では、前述したスクロースの加水分解過程を考慮するために、分解速度が生細胞の表面積と培地中のスクロース濃度に比例すること、非液胞の形成速度が培地中の単糖類濃度に比例することを仮定し、また、2つの単糖類濃度を1つの状態変数で表現するために、非液胞の基質収率は単糖類の種類によらず等しいものとした。

本モデルおよび3章のモデルを、以上のタバコ細胞培養に適用したところ、両モデルの適用結果に顕著な違いが見られず、どちらも実験結果とかなり良好に一致していることが示された。これより、本タバコ細胞培養では、細胞増殖や二次代謝物生産などの生物現象に対するスクロースの加水分解過程の寄与は速度論的にさほど大きくなく、これを考慮しない3章のモデルでも、本モデルと同様に、生物現象に及ぼす初期スクロース濃度の影響を表現できることが分かった。

## 第5章 総 括

本研究の内容を総括した。

## 参考文献

- 1) Frazier, G.C. : *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 313 (1989)
- 2) Hooker, B.S. and Lee, J.M. : *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 765 (1992)
- 3) Bailey, C.M. and Nicholson, H. : *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1331 (1989)
- 4) Bailey, C.M. and Nicholson, H. : *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 252 (1990)

## 審 査 結 果 の 要 旨

植物細胞培養技術は、植物が代謝する有用物質を工業的に生産するための有力な手段として注目されている。本研究は、この技術を用いた物質生産プロセスの工業化に際して重要となる培養槽単位体積当たりの生産性向上に関与する操作因子の解明を行うと共に、プロセスの制御や最適化のために必要となる培養槽内生物現象を表現できる速度論モデルの構築を行ったものであり、全編5章より構成される。

第1章は緒論であり、植物細胞培養技術の概要、ならびに本研究の目的と構成を述べている。

第2章では、2種のバイオリアクターを取り上げてタバコ細胞培養を行い、増殖に及ぼす各種操作因子の影響を検討している。その結果、各因子に細胞増殖に関する最適値が存在すること、リアクター培養では酸素供給能の増大よりも細胞に与える剪断力の抑制の方が重要な因子であることを明らかにすると共に、各リアクターの培養特性および最適操作条件を示している。

第3章では、植物細胞培養で観察される特徴を現実的な細胞構造に基づいて考慮した新たな速度論モデルを構築し、これをタバコ細胞培養に適用している。適用結果は、実験結果と良好に一致しており、モデルによって推算された原形質の含水率も、植物細胞の一般値とさほど矛盾していないことから、モデルの妥当性を確認している。また、このモデルにより、培地中へ放出された二次代謝物濃度の経時変化も予測可能であることが示されている。

第4章では、2種のリアクターによるタバコ細胞培養において、細胞増殖や二次代謝物生産などの生物現象に及ぼす培地中の初期基質濃度の影響を実験的に検討すると共に、3章のモデルに、この基質の加水分解過程を取り入れたモデルを構築し、この過程を考慮することの意義を速度論的立場から検討している。そして、生物現象に対する基質分解過程の寄与がさほど大きくないことを明らかにしている。

第5章は総括である。

以上、要するに本論文は、植物細胞培養技術を用いた有用物質生産の工業化のために必要とされる、培養槽当たりの生産性向上に関与する操作因子の解明、および、その培養槽内で起こる細胞増殖や二次代謝物生産などの生物現象を定量的に表現できる速度論モデルの構築を行ったものであり、細胞培養工学、ならびに生物化学工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士（工学）の学位論文として合格と認める。